



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **63088197 A**(43) Date of publication of application: **19.04.88**

(51) Int. Cl.

C07K 15/04
A61K 39/395
C07K 3/00
C12P 21/00

(21) Application number: **61230023**(22) Date of filing: **30.09.86**(71) Applicant: **TOSOH CORP**

(72) Inventor: **KONDO MASAHIDE**
INOUE KUNIYO

(54) **STABILIZING METHOD FOR MONOCLONAL ANTIBODY**

(57) Abstract:

PURPOSE: To stabilize a monoclonal antibody to denaturation and improve handleability thereof at the same time without other contaminating proteins, by containing polyhydric alcohols in a specific proportion in the monoclonal antibody.

CONSTITUTION: 2W60wt% polyhydric alcohols, e.g. inositol, etc., is contained in a monoclonal antibody solution to stabilize the monoclonal antibody. Furthermore, the above-mentioned monoclonal antibody solution containing the polyhydric alcohols is preferably kept at $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

COPYRIGHT: (C)1988,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-88197

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)4月19日

C 07 K 15/04
A 61 K 39/395
C 07 K 3/00
C 12 P 21/00

8318-4H
7252-4C
8318-4H
6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 モノクロナル抗体の安定化方法

⑯ 特 願 昭61-230023

⑰ 出 願 昭61(1986)9月30日

⑱ 発 明 者 近 藤 雅 英 神奈川県横浜市緑区桜台35-21
⑱ 発 明 者 井 上 國 世 神奈川県相模原市相模大野7丁目37番17号
⑲ 出 願 人 東洋曹達工業株式会社 山口県新南陽市大字富田4560番地

明 細 書

の方法。

1 発明の名称

モノクロナル抗体の安定化方法

2 特許請求の範囲

- (1) モノクロナル抗体を変性に対して安定化する方法においてモノクロナル抗体溶液に多価アルコール類を2~60重量%含有させることを特徴とするモノクロナル抗体の安定化方法。
- (2) 多価アルコール類が、グリセロール、イノシトール、ポリビニルアルコール、糖類又は糖アルコールである特許請求の範囲第(1)項記載の方法。
- (3) 糖類がシュクロース又はグルコースである特許請求の範囲第(2)項記載の方法。
- (4) 糖アルコールがソルビトール、マンニトール、ガラクトール、リビトール又はエリトリトールである特許請求の範囲第(2)項記載

3 発明の詳細な説明

[発明の利用分野]

本発明はモノクロナル抗体を変性失活に対して安定化するための方法、更には、多価アルコールにより安定化されたモノクロナル抗体の安定化方法に関する。

[発明の背景]

1975年に、ケーラーとミルスタインはB細胞ハイブリドーマを作成し、モノクロナル抗体を産生する方法を開発した(Köhler, G., Milstein, C. (1975) Nature 258, 495)。この技術によりモノクロナル抗体が均質な抗体として大量に供給される道が開かれた。今日では、モノクロナル抗体は、医学、生物学分野で広範な研究のみならず、分析、診断、治療および物質の精製などに用いられている。

従来より用いられて来たポリクロナル抗体は特定抗原の複数個の抗原決定部位を認識する複数種

の抗体分子(免疫グロブリン)の混合物と考えられている。従ってポリクロナル抗体は抗原で感作された動物の血清から調製されるという作業の非効率、煩雑さに加えて、均一の性質をもったロットが大層にえられないという難点がある。

一方、モノクロナル抗体は、一旦ハイブリドーマが樹立されると、このハイブリドーマを培養することにより均一で単一の免疫グロブリン分子を生産することが可能になる。こうしてえられたモノクロナル抗体は単一の抗原特異性をもち、性質の均一な抗体が恒常的に提供される。

一般にポリクロナル抗体は抗血清の形、抗血清の凍結乾燥品の形あるいは抗血清中にふくまれる免疫グロブリン画分の凍結乾燥品の形で供せられる。これらの中には、無数の分子種の異なった免疫グロブリン分子が含まれていると考えられ、抗体のクラス、サブクラス、分子量、電気的性質、抗原決定部位、抗原に対する親和性など蛋白質化学的性質に差がある。従って、抗血清から免疫グロブリン画分のみを純粋で、均一の免疫グロブリン

に精製することは不可能である。

このことは、「ポリクロナル抗体」という概念は、必然的に、血清成分を含有することを言外に意味している。即ち、単一の蛋白質分子であるモノクロナル抗体とは異なった概念である。

モノクロナル抗体はポリクロナル抗体に比べると特に分析、診断などの目的では、工業的に取扱う上で有利な点が多い。しかし、残念なことには、モノクロナル抗体は、一般に熱、酸、アルカリ、有機溶媒、界面活性剤、高イオン強度、攪拌などの化学的および物理的作用により、変性、失活されやすい。これは明らかに不利な点であり、抗体の精製、輸送、保存および診断薬や免疫吸着性クロマトグラフィー用担体の作成時の物理的、化学的あるいは生化学的処理において変性をひきおこす相当な影響が与えられる。モノクロナル抗体のもつこの不利な点のために多くの抗体の適用例では、ポリクロナル抗体が使用されている。一般にポリクロナル抗体はよりよい安定性を有するが、特異性が低く、目的とする抗原に関連した抗原に

対して交叉反応性を示す。即ち、ポリクロナル抗体を使用する場合には、試験の正確さ及び信頼性に限界がある。

例えば、治療剤テオフィリン又はアミノフィリンに対して特異的なポリクロナル抗体は、その他の共通したキサンチン、例えばカフェインやテオプロミンに対して交叉反応性を示す。従って血中テオフィリン濃度を免疫アッセイにより追跡している患者には、コーヒー、紅茶、コーラ、ココア及び類似の物質の摂取が禁止される。安定でさらに特異的なモノクロナル抗体を用いる免疫アッセイは、この問題をより減少させる。それゆえ、モノクロナル抗体の変性、失活をひきおこす物理的、化学的な影響に対して、モノクロナル抗体を安定化する方法および安定なモノクロナル抗体組成物が当該技術分野で要望されている。

モノクロナル抗体の安定性を増大させる方法のいくつかは知られている。

例えば、特開昭57-9723号公報には、血清アルブミン、卵アルブミン又はコラーゲン繊維が

ら誘導される蛋白質が記載されている。また、特開昭61-76423号公報には、卵アルブミン自体ではモノクロナル抗体に熱安定性を付与しないと云及しつつ、卵アルブミンが加水分解されたときに限り、安定性が付与されると記載されている。

しかし、これらの方法においては、単一の蛋白質としてのモノクロナル抗体に外来の蛋白質を加えることにより、もはや、モノクロナル抗体が蛋白質化学的に純粋ではない状態をつくり出してしまおうという問題が生じる。

例えば、モノクロナル抗体を診断薬や免疫親和性クロマトグラフィー用担体の形に加工して使用するとき、モノクロナル抗体を固相担体に吸着や化学結合で結合し、免疫アッセイや免疫親和性クロマトグラフィーに供されるとき、また、酵素や蛋白性の毒物、薬物との結合により標識され、免疫アッセイに又治療診断に供するとき、さらには蛋白質加水分解酵素の作用による限定加水分解により、モノクロナル抗体の断片を作成するときなど、

これらのすべての処理において、モノクロナル抗体に添加された蛋白質は妨害的に作用してしまい、当該モノクロナル抗体の用途を著しく限定することになる。

蛋白質は、個々に非常に特異的で異なった物性をもつ。例えば、pHや温度に関していえば、至適pHや至適温度のまわりの非常に狭い範囲においてのみ安定に存在しうるのであり、その両側では、急速に失活・変性する。しかもこの挙動は、個々の蛋白質においてかなり異なっており、実用的な意味において一般化して論じることが困難である。この複雑さは、蛋白質の構成アミノ酸の複雑さによるのみならず、その蛋白質溶液にふくまれる添加物や塩と蛋白質との相互作用や溶液物性への影響、さらに溶液の粘度、イオン強度、pH、温度や水の構造の変化などにより決定されると考えられる。従来、塩類やポリオール類や糖類を添加して蛋白質を安定化しようとした例は数多い。しかし、これらは、リゾチーム、アルブミン、リボヌクレアーゼA、キモトリプシノーゲンなど分

子量数万以下の単純蛋白質であり、サブユニット構造や補欠因子、あるいは蛋白質に結合した糖鎖をもつものに対して応用された報告は知られていない。モノクロナル抗体を構成する免疫グロブリンはG、M、A、Eなどのクラスがあるが最も一般的で分子量の小さいGタイプ(IgG)でも4本のポリペプチド鎖が数個のジスルフィド結合で連結された分子量約16万の高分子である。

IgG5個がジスルフィド結合でつながれたMタイプ(IgM)では、分子量は、約80万である。さらに、それぞれのクラスは、いくつかのリブクラスに分類される。

従来知られているポリオール類などの添加による蛋白質の安定化は、個々の蛋白質において一定してせず、ある場合には安定的に作用するが、別の場合には効果を示さなかったり、^{時にば}変性を助長したりする。とりわけ、~~時には~~ポリビニルアルコールやエチレングリコール、プロピレングリコールの作用は蛋白質により、かなり異なっている。例えば、エチレングリコール(30%)はリゾチー

ム、ストレプトミセス・ズブチリシン・インヒビターなどを安定化させる方向に作用するがキモトリプシノーゲンは凝固させる。さらに、グリセロール(30%)はキモトリプシノーゲンに対して、ほとんど安定化を示さないが前二者に対しては、グリセロールはよい安定化剤である。一方、三者に対してイノシドール(30%)は最良の安定化剤であることは知られている。

[発明の目的]

本発明は、以上の観点からなされたもので、その目的は、他の夾雑蛋白質なしにモノクロナル抗体を安定化させる方法を提供するところにある。

[発明の構成]

本発明者等は、従来技術のもつ問題点を克服すべく鋭意研究をかさねた結果、モノクロナル抗体溶液に多価アルコール類を2~60重量%含有させることによりモノクロナル抗体が安定化することを見出し、本発明に到達した。

本発明で使用される多価アルコール類は非蛋白性であり、透析あるいはゲル濾過、イオン交換ク

ロマトグラフィーなどの方法で容易にモノクロナル抗体を分離可能であり、かつ、モノクロナル抗体に通常施される化学的処理に対して不活性な化合物である。この多価アルコール類としては、イノシトール、グリセロール、ポリビニルアルコール、糖類又は糖アルコールをあげることができる。ここで糖類とは、単糖類、二糖類及び重合度が1000以下の多糖類をいい、例えばグルコース、シュクロース、アミロース、デキストラン等をあげることができる。このうち、入手の容易さ、モノクロナル抗体溶液への溶解性、価格等を考慮するとグルコース、シュクロースが好ましい。又糖アルコールとしては、C₄~C₆の糖を還元して得られるもので、例えばエリトリトール、リビトール、ソルビトール、マンニトール、ガラクトール等をあげることができる。これらの多価アルコール類から選ばれる少なくとも一種をモノクロナル抗体溶液に2~60重量%の濃度で添加すればよい。多価アルコール類の種類によって、添加量に差があるが、通常2重量%未満では安定化の

効果がなく、60重量%を越えてもその効果には差異がない。また、モノクロナル抗体は、水もしくは緩衝液に溶解しておけばよい。

本発明で用いられる多価アルコール類の溶解度は、かなりばらつきがあり、モノクロナル抗体の安定化のための最適濃度には、ばらつきが生じる。ここで、グリセロールとしては、2～60重量%、好ましくは20重量%以上がよい。イノシトールは2～60重量%で安定化効果を示すが、好ましくは20～40重量%であった。

ポリビニルアルコールは重合度50～2000において、モノクロナル抗体の安定性に寄与する。重合度50のときには、20重量%以上において安定化効果を示す。しかし、重合度が増大するにつれ、安定化効果を示すポリビニルアルコール濃度は低下する。例えば、重合度500のときには、5～7重量%で最大の安定化を示し、重合度2000のときは、2～3重量%で最大の安定化を示す。

糖類のうち、単糖類や二糖類の場合は、2～60

重量%のとき、好ましくは20～40重量%のとき、安定化効果を示した。

重合度が3～1000の多糖類については、濃度が2～60重量%好ましくは10～30重量%で安定化が達せられた。

糖アルコールの場合は、2～60重量%、好ましくは20～35重量%で安定化効果がみられた。

本発明の方法において溶液の温度は、蛋白質を取扱う際の常識として低温、すなわち10℃以下、好ましくは4℃以下に保存することが望ましい。実質的には、25℃にて数日間保存するには、問題はない。しかし、これより高い温度、たとえば60℃以上で数日間以上、糖類と蛋白質とを混合した状態で加熱すると、糖のカルボニル基と蛋白質のアミノ基の間でアミノ・カルボニル反応（メイラード反応）と呼ばれる反応がおこり、褐色色素が形成されることがある。しかし、かかる高温でモノクロナル抗体溶液を数日間にわたり保存することは、現実的ではない。さらに本発明の多価アルコール類は、凍結乾燥および凍結と融解とい

う物理的操作においても、モノクロナル抗体を安定化する。即ち、これらの物理的操作によって、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中のモノクロナル抗体の活性は通常5～10%失活するが、この失活を多価アルコール類を添加することによって完全に抑制することが可能となった。

〔実施例〕

以下に実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明は、この実施例のみにより限定されるものではない。

実施例1及び比較例1

マウス抗ヒト・インスリン・モノクロナル抗体（IgG₁）をリン酸緩衝食塩水（PBS）、pH7.4に1μg/mlになるように溶解した。対象としては、何も添加せず、試料用溶液にはグリセロール、マンニトール、イノシトール、ソルビトール、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール（重合度200）、シュクロース、グルコース、デキストラン、キシ

リトールを各々30重量%となるように、又、ポリビニルアルコール（重合度500）を7重量%となるように添加した。それぞれの溶液を70℃に加熱し、0.5mlずつ10分おきにサンプリングし、0.05%（V/V）ツィーン20及び0.5%（V/V）ウシ血清アルブミン含有PBS、4.5mlと混合し、4℃に一昼夜保存した。インスリンを結合させた96穴マイクロタイタープレートへこの加熱処理モノクロナル抗体を結合させ、数回洗浄ののち、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したヤギの抗マウスIgG-ポリクロナル抗体でインスリンに結合したマウス・モノクロナル抗体を捕捉し2,2-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）ニアンモニウム塩（ABTS）を基質として、ペルオキシダーゼ活性を、マイクロタイター・リーダー（使用フィルター：414nm及び492nm）を用いて測定することにより、モノクロナル抗体の吸着量、即ち活性を求めた。すべての場合に、マウス・モノクロナル抗体の活性の対数は70℃での

加熱90分間までは直線的に低下した。60分間加熱したときの残存活性を表1に示した。

表1

安定剤	残存活性 (%)	安定剤	残存活性 (%)
(対照)	30	ポリエチレングリコール	30
グリセロール	98	シュクロース	98
マンニトール	100	グルコース	98
イノシトール	70	デキストラン	70
ソルビトール	95	キシリトール	80
エチレングリコール	20	ポリビニルアルコール	100
プロピレングリコール	15	2 M NaCl	35

実施例2及び比較例2

マウス抗 β_2 ミクロプロブリン・モノクロナル抗体(IgG₂b)を用いて実施例1と同様の実験をした。

残存活性は表2のとおりであった。

表2

安定剤	残存活性 (%)	安定剤	残存活性 (%)
(対照)	32	ポリエチレングリコール	35
グリセロール	100	シュクロース	100
マンニトール	100	グルコース	100
イノシトール	100	デキストラン	75
ソルビトール	97	キシリトール	80
エチレングリコール	20	ポリビニルアルコール	100
プロピレングリコール	20	2 M NaCl	35

実施例3及び比較例3

マウス抗 β_2 ミクロプロブリン・モノクロナル抗体(IgM)を用いて実施例1と同様の実験を行った。ただし、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgMポリクロナル抗体を用いた。残存活性は表3のとおりであった。

表3

安定剤	残存活性 (%)	安定剤	残存活性 (%)
(対照)	30	ポリエチレングリコール	32
グリセロール	100	シュクロース	100
マンニトール	100	グルコース	95
イノシトール	100	デキストラン	75
ソルビトール	95	キシリトール	78
エチレングリコール	22	ポリビニルアルコール	100
プロピレングリコール	15	2 M NaCl	28

実施例4及び比較例4

マウス抗ヒト・インスリン・モノクロナル抗体(IgG₁)をりん酸緩衝食塩水(PBS), pH7.4に1 μ g/ ml になるように溶解し、これにマンニトールを0, 5, 10, 15, 20, 30重量%となるように溶解させ、実施例1と同様に70℃, 1時間の加熱処理を行い、モノクロナル抗体の残存活性を測定した。

結果は表4のとおりであった。

表4

マンニトール (重量%)	残存活性 (%)	マンニトール (重量%)	残存活性 (%)
0	30	15	75
5	45	20	82
10	62	30	100

実施例5及び比較例5

マウス抗ヒト・インスリン・モノクロナル抗体 (IgG₁) を1 μ g/mlになるようにりん酸緩衝食塩水、pH7.4に溶解し、これに各種重合度のポリビニルアルコール(PVA)を5重量%になるように溶解し、実施例1と同様に70℃、1時間の加熱処理を行い、モノクロナル抗体の残存活性を測定し、表5の結果を得た。対照はポリビニルアルコールを含まない場合の残存活性である。

表5

P V A		残 存 活 性 (%)
重 合 度	濃 度 (重 量 %)	
(対 照)		30
50	5	40
100	5	47
200	5	65
300	5	80
500	5	100
1000	5	100
2000	2	100
50	30	100

〔 発 明 の 効 果 〕

以上の説明から明らかなように、多価アルコール類を2～60重量%添加したモノクロナル抗体は、変性に対して安定となる。又、これらの多価アルコール類は、非蛋白性であり、透析もしくはゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー等により容易にモノクロナル抗体と分離可能であり、さ

らに通常モノクロナル抗体に施される化学的処理に対して不活性であるため、モノクロナル抗体の取扱いを従前以上に容易とし、よって各種分析、診断等の技術分野における本発明の利用価値は高い。

特許出願人 東洋曹達工業株式会社